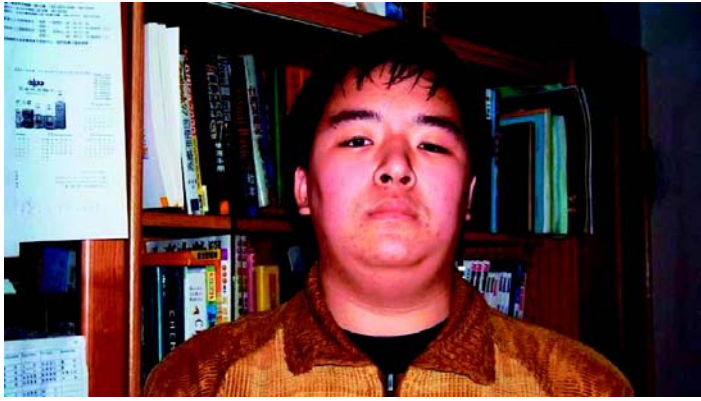


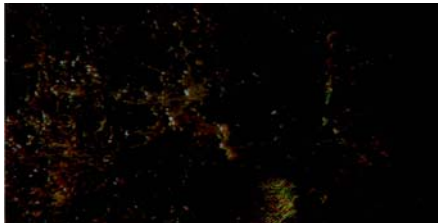
臺灣蚤蠅的研究 參加加拿大2000年科學展覽會 獲T.H.WILSON獎



作者簡介 作者:陳宗佑 就讀學校:

建國中學 指導老師:湯炳垣 蕭世裕 「實驗初始常是好奇的隨筆，最後卻總成為對永恆無期的挑戰。」陳宗佑，建國中學一年級學生，因為年輕加上不善言辭，原來抱著試一試的心情暖身的態度，參加國際科展。沒想到無心插柳柳成蔭，忐忑代表參加加拿大2000科展。祖父非常重視子女的創造潛力，家裡到處瓶瓶罐罐和數不清的大小儀器，父親年輕時也是建中生物老師楊義賢先生指導下的科展代表，祖父和父親之間的發明和專利更是家裡有趣的競爭。兩三年前，祖父肺癌逝世，父親也因為嚴重的實驗爆炸幾乎死亡，考慮不讓我再走這條路。金華國中老師陳義益和校長周韞維的鼓勵是最原始的推動力，建中吳武雄校長和徐正梅導師吹放自由花的紅樓精神，更提供這次參展的客觀條件。一年前在sleek研究室的細菌培養皿和中研院鄰近水果攤洋梨盒內無意中邂逅這隻小蚤蠅，引發許多生態、基因和共生的題材。也帶來我父親年輕時的老師的老師林飛棧教授，劉廣純教授，蕭世裕教授，方淑博士，林玉娟博士，湯炳垣老師和科教館指導的林榮耀及黎耀基教授數不盡的援手。當然在遙遠加拿大安大略會場天空裡，也依稀看見祖父在幸安國小樹下帶我撿葉子那熟悉甜美的笑容。

一、研究動機 發現蜿蜒蟲行的污染菌落. 最初想研究臺灣北部學校及家庭裡常見果蠅的腸內細菌時,由於培養基用量不大,直接向 BBL 公司購入調製而且倒好的Muller Hinton II Agar培養基,我的注意力被少數畫過細菌的培養基表面出現像蟲行蜿蜒的菌落所吸引;原先懷疑會不會公司準備時有部分細菌污染,然而高壓滅菌後再自己倒好的培養基也出現這樣的菌落. 立體解剖顯微鏡下這些線條是含有一種特別蠅蛆的污染爬行所產生. 開始認為是果蠅的污染;不過因為皿蓋縫實在太小不能容許胖圓形狀的果蠅通過,加上這種蠅蛆比果蠅蠅蛆還大,口鉤 mouth hook 形狀也不同而接近於正三角,果蠅污染的可能性被排除. 用塑膠袋放置一些污染的培養皿,我躲藏在牆邊觀察發現一種行動非常快速的小黑蠅溜入. 迅速將塑膠袋合上來不及逃脫的小黑蠅被捕捉,看起來頭尖身扁像裝備了翅膀的大跳蚤,它的移動風格敏捷如同跳蚤,具有瞬間爆發力. Figure 1.蜿蜒蟲行的污染菌落 特別的細菌菌落吸引同一種類,背部帶準星記號的小黑蠅. 所有吸引來的蠅蟲,明顯的有兩種,大小有異;卻都同樣的,背部有六道黑條紋,第二到六



的條紋中間朝裡面凹入處,帶有黃色,酷似步槍 槍管前端上的準星,特別是第四,五條紋的凹槽接近倒三角. 這些大的和小的黑蠅在桌子上培養皿裡頭或者周圍交配,顯示這個兩種蠅是屬於同種的. 雌性的尺寸較大,約為雄性的兩倍,產卵前腹部轉白呈圓形. 從這種黑色準星蠅最偏愛的細菌培養皿所含細菌菌落中間再重劃新培養皿. 等菌落充分地生長,再一次挑選黑色準星蠅所偏愛的細菌菌落,發現這種小蠅僅受一種特別的芽孢桿菌所吸引. 靠細菌就可以提供從卵到蛹全時期必須的食物原料? 只使用 Miller Hinton 培養基不會吸引黑色準星蠅,置入捕捉到的黑色準星蠅於 Miller Hinton 培養基裡也不會產卵. 生長特殊芽孢桿菌的培養基卻不費力的造成黑色準星蠅的世代相傳. 由這個報告我了解黑色準星蠅能只依靠Bacillus SK 完成它的生命週期,並能大量繁殖. 細菌Bacillus SK 對蚤蠅是一種病菌? 還是非絕對寄生,共生

的特殊芽孢桿菌? 因為昆蟲受精卵來出自體內不可能在這個時期感染細菌. 新一代的幼蟲怎樣去取得對它有益的細菌? 自然界裡靠機動性不大的幼蟲來搜尋特別的細菌不合理. 最可能是依靠母蠅在排卵同時也散佈所被徵求的細菌. 爲了實現這些, 一個前提: "蛹必須攜帶有幼蟲階段的芽孢桿菌" 要存在. 本文實驗用芽孢桿菌*Bacillus SK* 餵養黑色準星蠅, 一方面收集成蛹. 將蛹洗淨表面殺菌割開, 再投入培養液培養一天, 畫洋菜培養皿. 調查顯示蛹裡頭包含活的 *Bacillus SK*. 這種類細菌在蚤蠅體內會世代相傳. 爲什麼蚤蠅的人工培育較果蠅的人工培育, 相對

少有黴菌感染? 蠅和細菌之間的交叉飼養能否增加抗黴菌感染能力? 從飼養果蠅的過程裡, 理解蠅的人工培育較不受細菌污染影響, 但是受真菌侵染影響較大. 真菌感染的問題在使用果蠅大量的交配群 或者蚤蠅的人工繁殖. 仔細地觀察注意到若干伴隨著這些小蠅生長的細菌具有防止黴菌生長 的特性. 這些細菌明顯的屬於不同的種類. 試驗顯示*Bacillus SK* 有非常強大的抗真菌生長特性. 嘗試交叉飼養果蠅予以蚤蠅的*Bacillus SK*細菌, 希望能提供更好的抗真菌能力. 實驗結果完全出乎我的期待. 所有果蠅幼蟲被*Bacillus SK*殺死. 細菌*Bacillus SK* 能支持不同種類臺灣蚤蠅的生長嗎? 其餘的 *Bacillus* 或者不同屬的細菌也能支持蠅的生長嗎?

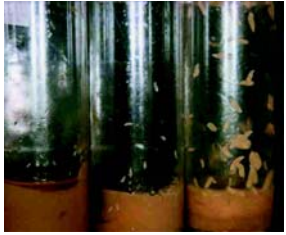
*Bacillus SK*對臺灣蚤蠅的生長支持十分獨特, 我也嘗試其餘的芽孢桿菌屬種, 發現多數無顯著幫助, 少數甚至傷害蚤蠅幼蟲. 二、研究目的 1. 重新建立從 1965年來, 匈牙利國家博物館 喪失的珍貴臺灣蚤蠅模式. 2. 調查臺灣最常見小型蚤蠅的特殊生活區域 及生物演化意義. 3. 比較臺灣本島常見蚤蠅的特質分類與中國 大陸蚤蠅的異同. 4. 理解蚤蠅獲得腸內細菌的途徑和利用其菌 種的方式. 5. 探討共生菌對抑制黴菌生長保護蚤蠅食物 的貢獻.

三、研究材料及設備

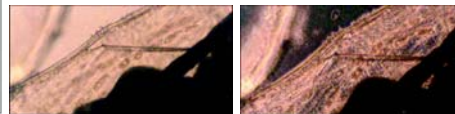
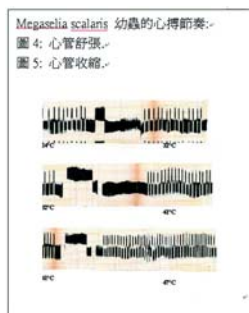
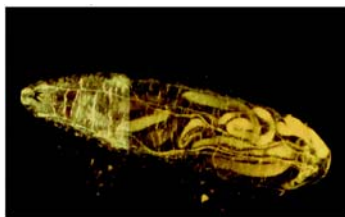
儀器及設備 立體雙眼解剖顯微鏡 Olympus sz-pt, 照相機 Olympus sc35 TYPE 12 倒相光學顯微鏡, 一般光學顯微鏡, 穿透式電子顯微鏡, 細菌培養箱, 32°C 蠅箱, 電泳設備: 蛋白質電泳設備, DNA蛋白質純化設備, 蛋白質染色設備, DNA UV盒零下80°C 冰箱. 材料 細菌種類 *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thermodenitrificans*, *Bacillus larvae*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus amylolyticus*, *Agaricus arvensis* CCRC 36371, *Aspergillus ochraceus* CCRC 300101, *Aspergillus fumigatus* CCRC 30099, *Aspergillus niger* ATCC 9642, *Aspergillus flavus* CCRC 30119, *Aspergillus vesicolor* CCRC 30225, *Aspergillus candidus* CCRC31129, *Aspergillus terreus* CCRC 32664 (terrium production), *Aspergillus terreus* CCRC32653, *Saccharmyces cerevisiae*, *Zygosacchromyces rouxii*. 材料及化學藥品 培養皿, Miller Hinton II Agar培養基, LB broth 培養液, 蜂蜜水, 乳酪, 水煮鮭肉, 鳳梨片, 葡萄乾, 濾紙, 塑膠封面, 標本針, 鑷子, 皮下注射器, 蓋玻片, 載玻片, 細菌接種環, 指甲油, 封片基質, 保利龍, 玻璃管, 簡易組織DNA抽出配套E.Z.N.A. Tissue DNA kits (Omega

Biotek), 液態N2. 玉米黑糖酵母粉培養基(簡稱林氏果蠅培養基: 爲中研究院林飛棧教授留美回臺後就本地之資源所大大推廣之配方: 900c.c.蒸餾水, 10 gm agar, 30gm酵母粉, 40gm黑糖, 100gm 玉米粉. 四、研究過程及方法 捕捉陷阱的設計: 9cm 塑膠培養盤是最好的捕捉器, 使用細菌*Bacillus SK*捕捉蚤蠅. 培養皿中央挖一壹圓大小圓孔, 用刺有小

透氣孔的透明膠片貼補該圓孔, 透明膠片三邊使用膠帶黏牢, 最後一邊不黏以方便外面蚤蠅的進入. 飼養蚤蠅的方法: 沒有Bacillus SK 的 Miller Hinton II 培養基一個星期觀察, 沒有任何成長反應. 添加多樣的維他命或者牛奶也無大幫助. 只Bacillus SK在LB.broth中繁殖後離心, 蒸餾水washed兩次, 也能沒有疑問地支持蚤蠅從幼蟲到成蠅完全的生長. 最好的繁殖方法: 將牛肉燉湯(100克磨碎肉, 100克 D-葡萄糖和 400 克 H₂O 燜 121°C 三十分) 摻雜Bacillus SK, 直到OD 0.3, 再培養在 32°C 搖動器, 24小時. 將這個broth分裝入小瓶中. 每天加入果蠅培養基 1.5 cc, 蚤蠅幼蟲迅速成長. Figure 2幼蟲的迅速生長



蚤蠅幼蟲的活體觀察: 低壓膠黏法. 將蚤蠅幼蟲用10% Polyvinyl Alcohol, 4% Poly eth ylene Glycol 黏膠壓在3cmx 3cm 透明投影片和載玻片之間. 使用倒相式顯微鏡能清楚的觀察幼蟲內部的腸蠕動, 甚至看到心跳.(昆蟲心臟為搏動的大血管). 幼蟲在觀察8小時後仍未受損傷. Figure 3 Live Observation of Megaselia scalaris Larva Under Reverse Phase Microscope) Figure 4, 5 蚤蠅活體 的心管收縮 蚤蠅的組織切片: 蚤蠅的幼蟲依照前述飼養直到成蛹前兩天, 依甲醛固定, 石蠟埋置, 再切片, He ma tox y lin/Eosin染色. 本文的切片出自臺北醫學院病理學科朱娟秀主任醫師的熱心幫助. DNA萃取法: 一般 DNA萃取法使用E.Z.N.A. Tissue DNA Kits (Omega Biotek), 首先取蚤蠅的幼蟲(蛆), 以液態氮將之冷凍磨碎成粉末, 取約30mg加入



200ul 緩衝溶液 TL, 再加入25ul Proteinase K (20 mg/ml)於55°C下反應3小時;以下依 Kit步驟進行。細菌的 DNA抽出取菌液離心成 pellet, 再依上述步驟進行. Single fly DNA萃取法: 取成蠅一隻, 或者琥珀fossil marker VIII 加入 1.5ml 離心管含磨蟲液60 ul (1M Tris-(0.25ug/ul, Cat.No.1336045, Berhinger HCl, pH8.0, 10% SDS, 20mg/ml Proteinase K (Mannheim) 做標記, 再以20μM Ethidium Bromide染色, UV燈觀察電泳結果。DNA定序: 參照Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(Cat.No. 401148, Applied Biosystems, Inc.) 將自己製備的 PCR產物或或直接外送至 ABI PRISM公司進行定序, 自動定序儀會經過內附的電腦程式將所定的序列自動 歸檔在電腦裡頭. 芽孢桿菌屬種的分子生物學鑑定方法: 根據細菌革蘭氏染色, 和生化試驗Bacillus SK 可以歸入 Bacillus屬morphology group I, (菌絲有孢子所在, 菌體沒有腫起). 這個群組常見有Bacillus subtilis, Bacillus

取所得DNA 10ul，加入10x buffer (2.5mM), MgCl2 (3mM), dNTP (250uM), primer (20pmol), Taq polymerase (1.2U), 及無菌水，使總體積為25ul，加入1滴礦物油，進行PCR反應(Perkin Elemer)；反應條件為98℃, 2min，1cycle；94℃, 1min，38℃, 1min，72℃, 2min，35 cycles；72℃, 10 min，1 cycle。電泳分析: 萃取所得DNA及PCR產物，用1.5% Agarose電泳，加入 5uL DNA molecular weight

ceres,...我爲了進一步區分芽孢桿菌種和種的差異, 使用下列分生技術: 限制酶水解基因片段多樣性圖譜(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP) 提取Bacillus SK 或其餘芽孢桿菌的total DNA 後,做限制酶切割, 再以質體plasmid複製 DNA Bacillus SK的一小片斷接合. 從這些接合的圖案理解限制酶切部位的異同研判兩種bacillus是否擁有同樣DNA 信息. 任意基因放大多樣性圖譜(Random Amplified Polymorphic DNA ,RAPD) 從 RAPD 看Bacillus sk 和其餘的Bacilli相似性及相異點. 複製Bacillus SK 所含16S和23S ribosomal RNA 的部分DNA 序列: 主要是鑑別Bacillus SK 和 Bacillus subtilis 的差異.

Table 1. 本研究對蚤蠅及其共生細菌進行PCR與RAPD反應所使用的引子種類 動物發病的評鑑:在小Balb/C 白鼠細胞.細菌培養在2ml LB 肉湯至early stationary phase早平熟期.全部溶液用Sigma小離心機microfuge 設備,旋轉15,(

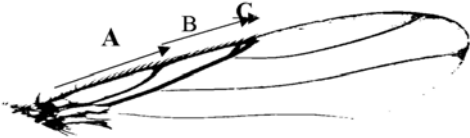
Table 1. 本研究對蚤蠅及其共生細菌進行 PCR 與 RAPD 反應所使用的引子種類

PCR 引子	引子序列(5'→3')	產物位置
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	18S
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	18S
NS5	AACITAAAGGAATTGACGGAAG	18S
NS6	GCATCACAGACCGTGATTTGCCTC	18S
NS7	GAGGCAATAACAGGCTGTGTATGC	18S
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS
ITS5	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG	ITS
FF1	TCGTAACAAGGTTTCCG	ITS
FF2	GTTAGTTTCTTTTCCTC	ITS
RD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	16S
FD1	GAGGTTTGATCCTGGCTCAG	16S
16SR	ACTGCTGCCTCCCGTAG	16S
16ScutF	TAATACCGGATAATTTTCAGC	16S
23SR	CAGCACCGGGCAGGTGTCAACCCC	23S
23ScutF	TAAGTAGGCAATCCGTTTACGT	23S
RAPD 引子	引子序列(5'→3')	
OPB11	GTAGACCCGT	
OPB12	CCTTGACGCA	
OPB13	TTCCCCCGCT	
OPB16	TTTCCCCGGA	
OPB19	ACCCCCGAAG	

Table 2.各種不同芽孢桿菌和 Bacillus SK 的比較:

	B. subtilis	B. Cereus	B. SK	B. Thuri
Colonies on LB plates	flat	Flat	Elevated	Flat
Colonies on blood agar	flat	Flat	Umbilicated	Flat
		Rough		
血球溶解 (sheep RBCs)	beta	Beta	Beta	Beta
Lecithinase 產生 (卵黃反應)	-	+	+	+
氨基酸發酵				
酸形成				
葡萄糖發酵	+	+	+	+
Mannitol 發酵	+	-	+	-
厭氧的生長	-	+	Poor	+
檸檬酸使用	+	+	+	+
能動性	Motile	Motile	Motile	Motil
動物發病 (I.P.injection into Balb/c mice)				
Washed cells	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Resistant To penicillin	+	+	-	-
Resistant To cephalosporin	-	+	-	-

沈澱分開. 細菌細胞沈澱則用另液2ml 100mM



磷酸鈉緩衝液 pH 7.0懸浮及離心.Balb/c 鼠在注射後仍然生存,就分類為 N.E. 合使用八隻Balb/c雄鼠 (15-20gm),同組每隻老鼠顯示同樣的結果. 爲了測量不同枯草菌Bacilli防止指示菌生長的方法" 敘述完成. 各種各樣枯草細菌接種在指示培養菌皿上, 培養37C二天,菌落帶有透明帶環 (no growth of indic Schmitz standard (1938). 翅長: 前緣脈基部有一短脈叫前緣基脈,上有兩 根長鬚毛. 翅長指鬚毛的基部直到翅末端 costal index : 前緣脈長度和翅長的比率. 分段比ratio: A:B:C. Figure 6 前緣脈指數costal index 和前緣脈的分段比.五 生成蠅的警戒心相當高除了進食或者交配時會停頓下來, 在受刺激或者光線照射時迅速而不斷移動,大量活捉

得大量同種蚤蠅研究材料的好方法. 最初的趨性研究 各種帶菌或者不帶菌的培養皿被用來測試吸引小黑蠅及促成產卵的效果. Table 3 從野生環境收集的成蠅對不同培養皿的反應: Y: yes, N: no. 測驗敘述如正趨性. 進一步關於不同種的芽孢桿菌的試驗將在以後的實驗討論. 成蠅的維生 Table 4 成蠅在各種營養狀況的生命長短 早先的實驗中, 不理解這黑準星蠅的成蠅無法在太潮濕的環境下生存. 用長玻璃管加上 0.5cc 任何一種類液體食物, 管內蠅大約 2天內就全部死去. 微濕的培養是不可缺的: 在以後試驗中, 採用直立玻璃管, 內置一長條Poly sty rene 泡綿再添加 table 3 所敘述各種各樣的液體或固體的食物. 成蠅的繁殖 Table 5 成蠅在各種不同培育狀況的繁殖能力

Table 3 從野生環境收集的成蠅對不同培養皿的反應:

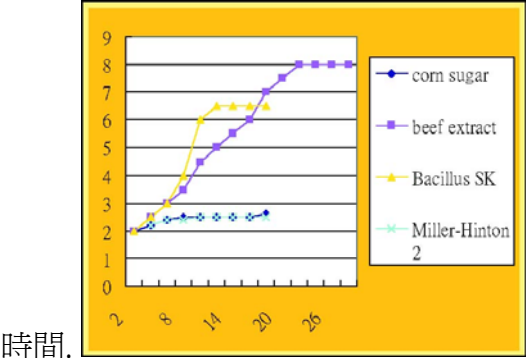
	Lactose MacConkey's plate	Lactose MacConkey's plate+ E.coli	LB plate With Bacillus SK	LB plate With Bacillus ceres	LB plate With E.coli
邊緣徘徊	N	N	Y	Y	N
中央圓圈進入	N	N	Y	N	N

存活天數	水	牛奶	果 蠅 培 養 基	味 噌	LB plate	LB plate+ Bacill us SK	水 煮 鮭 肉	乳 酪	乳 酪 + 蜂 蜜 水	蜂 蜜 水
雌性成蠅	1天	1-2天	2天	2天	1-2天	3-5天	1-2天	2-3天	>14天	>14天
雌性成蠅	1-2天	2-3天	3天	2天	2-4天	3-5天	2-3天	3-4天	>20天	>20天

Table 5 成蠅在各種不同培育狀況的繁殖能力

	LB Plate	LB Plate+ Bacillus SK	水 煮 鮭 肉	乳 酪	乳 酪 + 蜂 蜜 水
產卵		2-4小時	1天	2天	2-7天
幼蟲 成長	5-6天	5-6天	5-6天	20天	20天
成蛹	N	在 一 週內	超過 20 天	N	N
弱化成蟲	N	Y	Y/N	N	N

幼蟲的生存及培育 如果飼養在一個畫滿 bacillus SK 的 9cm 直徑的培養菌盤子, 只能將一定數量(大約10隻)的蚤蠅從幼蟲正常的扶養到成蠅. 過多的幼蟲會使得幼蟲生長遲緩, 形狀細小. 碰上這個狀況, 再補充Bacillus SK 就能維持繼續的生長和發育. 雖然產卵被不同的食物狀態所影響, 一旦產卵, 幼蟲孵出卻不受受到太多影響的. 另一方面, 食物對幼蟲和蛹的影響是極端複雜: (1) 在沒有高蛋白質或者 Bacillus SK的狀態: 幼蟲的生長和發育都受嚴重的遲緩, 蛹形 成困難(Fig.10). (2) 在用水煮鮭肉為唯一的食物時, 蚤蠅幼蟲 儘管持續變長變大, 卻比使用 Bacillus SK 為食物的幼蟲遲緩兩週以後蛹化, 蛹化成 蠅的百分率非常低, 少於10%(Fig.11). (3) 使用牛肉抽液(沒有添加 bacillus SK), 幼蟲明顯的成長 蛹形成也延緩兩週, 蛹化 成蠅的百分率儘管增加到80%, 然而蛹化時 間卻長達四週. 添加廣效抗生素ampicil- lin, 蛹期延長一倍

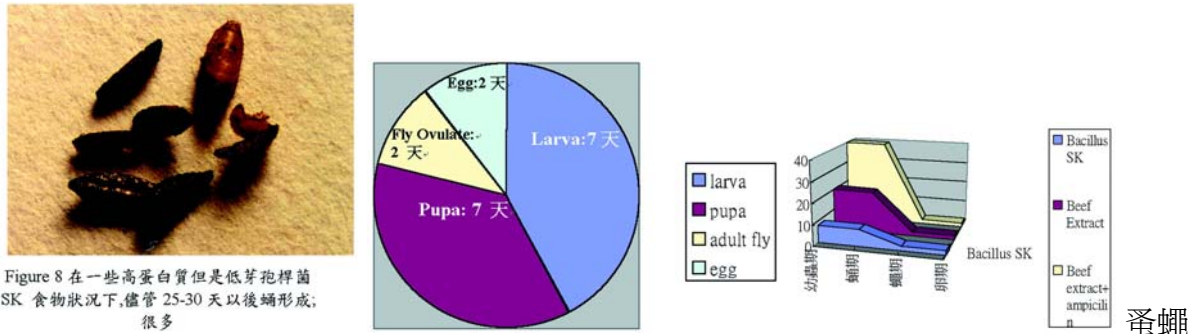


時間.

Figure 7 各種生長培養基對蚤蠅發展的影響
芽孢桿菌 SK: washed Bacillus SK, Miller Hinton II Agar, 牛肉抽出液, 玉米糖食 配製預備過程敘述如本文的方法中。

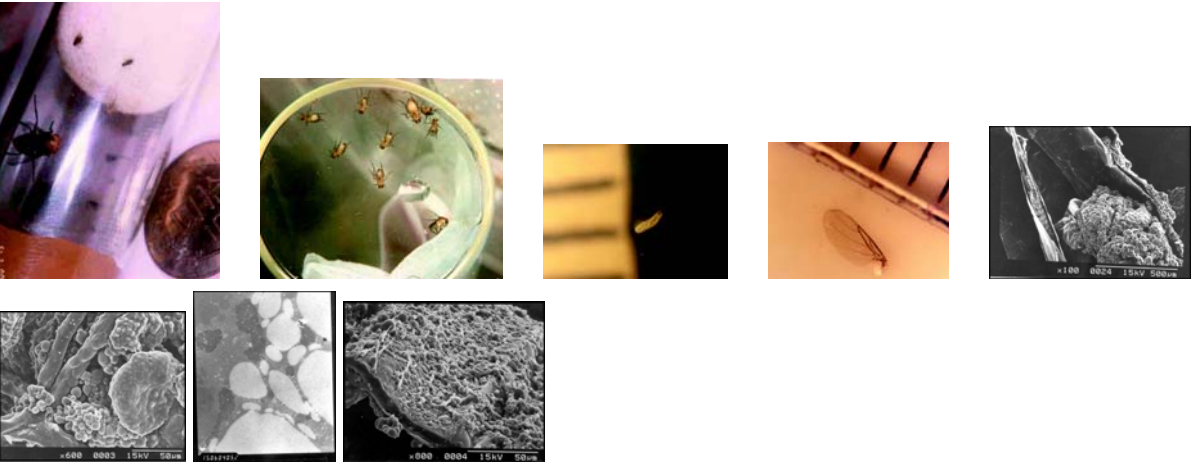
10個蚤蠅受精卵一組，每種食物群 5 組觀察生活史差異. Figure 9 *Megaselia scalaris* Taipei Chen的正常生活週期 Grown With Bacillus SK On Mill er Hinton Plate at 26°C. Figure 10 各

種不同的食物狀態對蚤蠅生長和發育的影響



的形態特徵 Figure 11~17 Coin:2.5cm, Housefly:0.7cm *Megaselia scalaris*:adult fly 2.2 mm (female) 1.6 mm (male) egg,larva(just hatched):0.4mm wing length:1.8-2.0mm larva (longest before metamorphosis) 8mm *M.scalaris* cell size: 8-15 μm Bacillus SK length: 2.8 μm virion particle diameter:30nm 性別,生殖,形態,解剖 頭胸和觸角: (Fig.18-19) 雄性動物: 額方, 黃褐色,單眼區域附近褐。 表面有褐短毛,觸角上鬚毛2對,幾乎等長, 觸角第三節球形,淺黃色,

芒: 0.6 mm,被微 毛。 下顎:黃色的,寬闊像半月球, 近基部弱



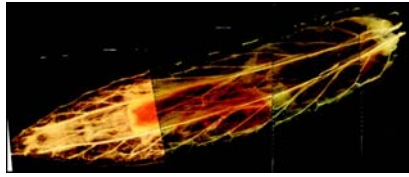
的鬚毛三根,端部: 三根鬚毛比較強. 小盾 片鬚: 兩根,短毛兩根. Fig.18 Fig.19 蠅自蛹內羽化後,立即會迅速奔跑而翅芽在30分鐘內伸展齊全. 兩翅發達,雌性翅和雄性翅呈相同外貌.翅脈相當簡單,完全沒有橫脈,縱脈分爲兩個部分:前面三條粗縱脈明顯粗大,顏色深暗;後面的四條細縱脈,細薄色淺.前二條 細縱脈和粗縱脈並沒有直



Fig.21背部的條帶 腹部腹面黃色, 第四, 五, 六節後緣各一排毛, 其食的光裸, 尾部亮黑色, 肛管黃色, 生殖背板對稱的.生殖腹板不對稱,左側的大. 幼蟲的孵出和成長 室溫 (25C)下,兩天裡卵孵出.蟲從縱長的

接的銜接,第四條細縱脈比前三條細縱脈,更微弱纖細,顏色更淺,和粗脈近側基部有相銜接,這些和道氏錐蚤蠅 *Conicera dauci* 及角啄栓蚤蠅

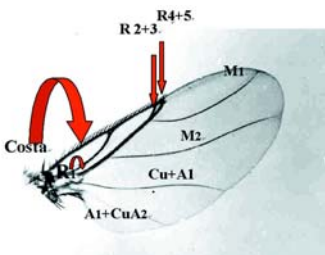
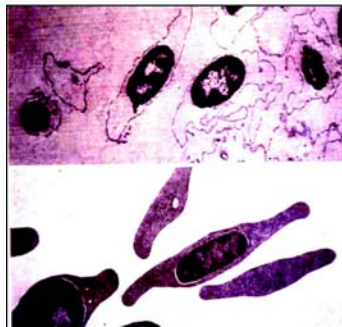
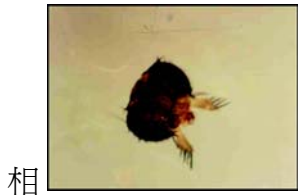
Dohrniphora cornuta 的翅膀完全相同. 但是 r_{2+3} 脈存在, M_1 脈基部和 rs 脈主軸成 50° 角而非直角,這兩點和道氏錐蚤蠅 *Conicera dauci* 非常不同的. 亞前緣脈 SC 和前緣脈 C 相交在前緣脈約 $1/2$ 長度位置, 這個交叉點和第二條細縱脈與 rs 脈主軸的交叉點在幾乎同樣相對稱位置,彼此呼應. 這些不同於角啄栓蚤蠅 *Dohrniphora cornuta* 的翅膀. 前緣脈指數: 0.55, 各段比: 21:18:5 Fig.20 特別的蚤蠅翅膀脈



腹背板黑色, 前緣中間包含黃色的斑點. 特別背板 IV 和 V 最大. 背板 VI 為單一的黑色, 背板 II 兩側包含毛 6 根.

卵一末端滑出行出. 孵出百分率一般高達80%以上. 蟲一出生, 能超過1年蚤蠅對環境挑戰做更大程度的忍受. 在沒有食物的狀態下(只依靠添加幾滴蒸餾水保持濕潤的狀態)幼蟲能在一週之後仍然從容地生存. Figure 22 Figure 23 使用雞紅血球細胞飼育蚤蠅幼蟲

腹背板黑色, 前緣中間包含黃色的斑點. 特別背板 IV 和 V 最大. 背板 VI 為單一的黑色, 背板 II 兩側包含毛 6 根.



介乎中腸和後腸區域兩者之間腸內粗細變化所在,也是紅血球食物顏色從紅轉褐的地方. 這顯示蛋白質水解或者細胞溶解大部分在後腸, 前中腸則執行貯藏任務. 用針吸取後腸及中腸的血球顯示差別在喪失血紅素(細胞膜相對較完整的保留著). 完全變態和蛹裂 Figure 24 蛹: 氣管及 T 形蛹裂縫 蚤蠅的自然生態的調查 Figure 25 準星蚤蠅的區域分配, Taipei 近郊, 1999. 雖然臺北日常生活中經常可見準星蚤蠅活蹦亂跳. 安裝菌餌捕捉 3-6 小時, 我常常抓住 20-30 隻. 然而 2-3 天, 卻不能在臺灣田野和山郊(苗栗, 桃園, 八里, 五股, 岡山山區) 發現準星蚤蠅的蹤跡. 在臺北近郊的小型住所, 工業, 農業交



蛹的 T 字型裂開
若干學者相信蚤蠅
蛹解出的方式介乎
環裂和縱裂之間. 在
有氣管的蛹端以 T
字型裂開



雜區(臺北縣洲子尾成泰路三

段: 一邊是洪水平原區, 綠色代表長草和蔬菜, 淺藍色是淺污水, 灰色是小型加工廠; 另外一邊是標紅色的住宅區, 黃色顏色的是公路和巷道. 地圖裡的黑點標明出放菌餌捕捉器的位置, 黑點近旁白色的號碼代表 6 小時裡所捕捉的準星蚤蠅數量. 非常顯著的對照, 簡單地說連一路寬的分離, 準星蚤蠅像蟑螂一樣, 特別熱愛人類的文明. 準星蚤蠅在人類活

動中的環境分佈,適應住宅區的能力早已遠超過適應野地的能力. 因為蚤蠅成蠅很少像果蠅成群結隊,我不容易追蹤,不理解究竟準星蚤蠅在人的生活環境維持多 大的族群? 藏在哪裡? 怎樣取食? 花費許多時間發現幾個準星蚤蠅在自然界產卵的地方?腐爛的錨紋瓢蟲 *Lemnia biplagiata*,果蠅 *Drosophila*, 家蠅 *Musca domestica*, 棘蟻 *polyrhachis* sp. 非常有趣的,我也在一罐丟棄的腐敗牛肉精瓶口邊緣發現準星蚤蠅產下有鋸齒的卵. Figure 26自然界蚤蠅明顯產卵場所 Figure 27,28 昆蟲殘骸成為蚤蠅幼蟲偏愛的食物 臺灣蚤蠅具有散佈污染實驗室微生物的潛力 臺灣常見被petri dish細菌(芽孢桿菌或其餘桿菌)吸



引的蚤蠅

Figure 29,30蚤蠅蛹形成在微生物實驗室裡最常見的富有滋養的細菌培養皿上面. Figure 31,32,33,34 臺灣全境84處臨床檢驗所採集 *Bacillus* SK plate 所吸引的蚤蠅. 總括 250 個 plates 容納2100蠅體和蛹孵出蚤蠅品種主要有三種, *Megaselia scalaris* 佔了 90%. 蚤蠅品種的分子生物鑑定 過去100年來,臺灣的蚤蠅由外國學者採集,轉移到歐洲鑑定.距離遙遠,年代長久加上模 式遺失. 作對照研究非常困難, 藉由本研究的大量捕捉和繁殖 ,我以現有的 18S,28S rDNA探針來研究 *Megaselia scalaris* (Chen,Taipei) 的特別 DNA序列. 首先取得許多ribosomal DNA primer set FF1: TCG,TAA, CAA,GGT,TTC,CG; FF2:GGT,AGT,TTC,TTT,TTC,TC.所得 DNA 片段,經過 ABI prism Model 377 DNA autosequence . 因為直到目前蚤蠅全科任何一個 gene 序列仍未被發表, 這裡首先以在臺灣北部養殖5代的 *Megaselia scalaris*(chen)認證.

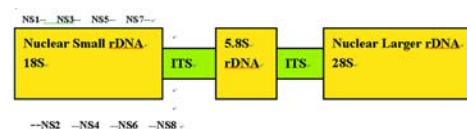
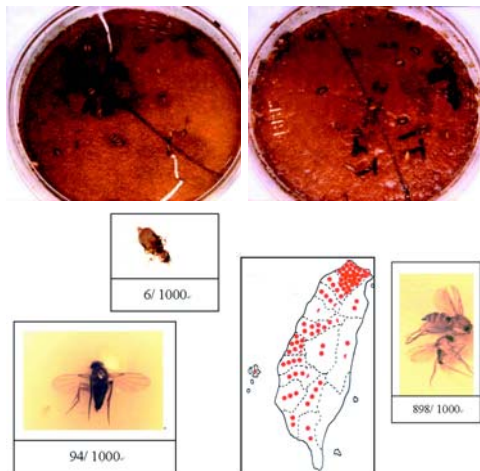


Figure 35 Probe description.

>18s rRNA gene of FF

```

ATTCTGGTTGATCCTCTCCGTCGGGACGGGCTGTAGNCTATGCTTGCTGCTTACG
GAATTGACGGAGATGATCAGTATGCTTGTTCCTTAAAGGAAATGGACGGAAAGGAGT
ACTGATGTGCTTGTATAGCTAATACATGCATTATAAGCACGGACCTTTTGGAACTGT
TGCCTTTATTAGGCTAAACCAAGCGATCTTTCGGGAATCGTTGACTGGTTGAACCT
CTAGATTAACCTGCGAGTCGTATGGCTTTGACCGACGACAGATCTTTCAAATGTCG
CCCTATCAACTATTGATGGTATGATCTAGAGCTACCATGGTTGCAACGGGTAAACGGG
GAATCAGGGTTGATTTCCGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACTCTAAAGAA
GGCAGCAGGGCGCTAAATTACCACCTCCACGACGGGGAGGTAGTGACGAAATAA
CAATACAGGACTCGTATCCGAGGCCCTGTAAATGGAAATGATACACTTTTAAATCCTT
TAACAAGGACCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCACGCCGGTAAATCCAGCTT
CAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCGGTAAAGCGTTCGTAGTTGAACCTTGTCCTCC
ATACGGGTAGTACACCCATCAATTGGGTTTGTACATTACTCTATGGTATGTGAGCGT
ATTACCGGTGGAGTTCTTATATGTTATGTTACTTGTATTATAGCGTATTCCTCCTAT
TCAACCTACTTCAGTGTCTTCTTATCGATGTTGTTGTGGGCGGTACAATTACTTT
GAACAAATTAGAGTCTTAAAGCAGGCTTCAAAATGCTGAAATTTTGTGATGGAAAT
AATGGAATAGACCTCTGTTCTACTTTTATTGGTTTATAGATCAAGAGGTAATGATT
AATAGAAAGCAGTTTGGGGGCTTAGTATTACGACGCGAGAGGTGAAATCTTGGACC
GTCGTAAAGACTAACTTAAAGCAAGCATTTGCCAAGATGTTTTCAATTAACAAAGAA
CGAAGTTAGAGGTTTGAAGGCGATCAGATACGCCCTAGTTCTAAACATAAAGAT
GCCAGCTAGCAATTGGGTGTAGCTACTTTTATGGCTCTCTCAGTCGCTCCGGGAAA
CCAAAGCTTTTGGGCTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAGCTGAAACTTAAAGGAAT
TGAACGGAAGGGCACCAACAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAAATTTGACTCAACACGGG
GAAACTCACAGGTCAGACTTCTGTAGGATTGACGCTTGGCGATGCTTCATGATT
AGAAAGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTCGTGACGTAAAGTTGTCTGCTTTATT
GCGATAACGAGCGAGACCTCGGCCGCTAGTTGCCAGAACTCACACTTTGTGAGTCTT
TGGCTCTTAGCGGGACTACCGGAGCAATTTCGGGGAGGTTGAGGGCAATAACAGGT
CTGTATGCACTTAGACATGCTTGGCTGACGCGCGCTACACCTGACCGAGCCAGCA
GTTAATCCTTGTCCGAAAGGAACGGGTAACTTGTAAACTGCGTCTGATGGGAT
AGAGCTTTGCAATTTTGTCTTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAGCTAAGTCATCAA
CTTGGCTTATACGTCCCTGCCCTTTGACACACCGCCGCTGCTTACCAGATTG
AATGGCTTAGTGAAGTCTTAGGAGGATTCTTGACAGGGCAACCTTAGCGAGAAA
CCAAATTCATCAACTTGGTCAATTAGAGGAATACAAGTCGTAAACAGGTTTCCG
TAGGTGAACCTGCGGAGGATCATT

```

ITS1 of rRNA gene of FF:

```

TCTGAAGGCTTTTTCGCAAAACCACTGTGAACAGCTTAGACTTCGGTCTTTGCAATT
GCTTGGGTGTGCAAGGGCGCCCAATCTTAAACCTTTATATTTGTCTGAAACAAT
GAAATTTTAAACTTTCAACACGATCTCTTGGTCTCTGATCGATGAAGAACGCA
GCAAGCGCGATAGGTAAAGCAATTGCAGACGTGAGTCATTGAATTTTGAACGCA
TATTGCGCTATTAGTTTGTCTAATAGCATGCTTGTGGAGTGAATACTTCTCTCA
ACCAATTTTGGTATGAGTCTTGTCTTTTGAAGTTTAAATCATGGAAGTGACACA
CGTTAATTAACCTGTGCAATTATACATTTTATCCTCCATCAAGCAAGGGTACC
CCCTGAACCTTAAGCATATTAAAGCGGGGAAAGAACTAACA*

```

0 500 1000 1500 2000
DNA base

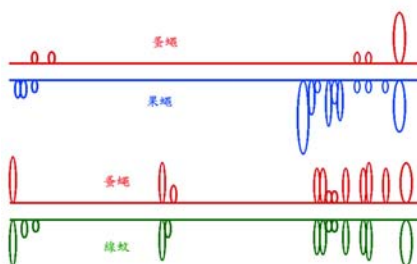
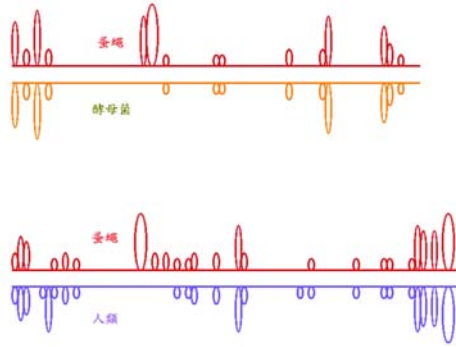


Figure 36 這前述18S rRNA 基因序列的對照顯示Megaselia scalaris的300-500 核苷酸基對相應演化的觀點最穩定不變, 相對靠近 Drosophila melanogaster 和黑斑蚊Aedes屬。

Figure 37 蚤蠅之18S rRNA基因與果蠅、線蚊、酵母菌和人類之18S rRNA基因比較之結果 芽孢桿菌菌落對蚤蠅的影響 Bacillus SK 吸引蚤蠅的特性沒有其它細菌能競爭 雖然蚤蠅在不同的細菌培養皿被發現, 實驗發現不同細菌菌落對 Megaselia scalaris 的吸引力, 有很大的差別. 取 Streptococcus faecalis (仁愛醫院), Staphylococcus aureus CCRC 14945, Bacillus cereus CCRC 10250, Bacillus thuringiensis, kurstaki CCRC11498, Escherichia coli

K12 CCRC 10450, *Klebsiella pneumoniae aerogenes* CCRC14897 culture 在 80% 劃滿的 Miller Hinton II Agar 上. 類似研究探究正趨性的方法: 在一個邊長 80cm 透明壓克力立方盒裡中央開始放置前述的細菌培養皿 PLATE 50 隻雌和 50 隻雄蚤蠅., 靜置 5 分鐘以後記錄各個 plate 蚤蠅的的數目, 每 30 分反覆的 觀察和記錄. 下圖顯示不同的時間不同的蚤



蠅誘餌盒的蚤蠅數目.

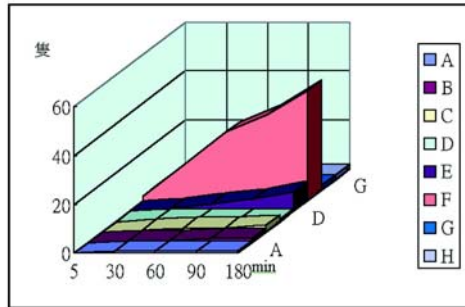
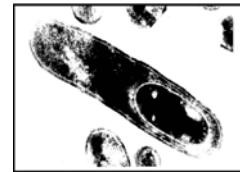


Figure 38 *Bacillus SK* 是引誘蚤蠅最有力的細菌. A. *Streptococcus faecalis* (仁愛醫院), B. *Staphylococcus aureus* CCRC 14945, C. *Bacillus cereus* CCRC 10250, D. *Bacillus thuringiensis*, kurstaki CCRC11498, E. *Bacillus subtilis* F. *Bacillus SK* G. *Escherichia coli* K12 CCRC 10450, H. *Klebsiella pneumoniae aerogenes* CCRC14897 八種細菌/Miller Hinton plates 對 *Megaselia scalaris* 蠅的吸引. Figure 39, 40 *Bacillus SK* of gross view and TEM picture 芽孢桿菌對黴菌的作用: 繁殖果蠅時, 易受黴菌污染傷害它的幼蟲. 蚤蠅幼蟲同樣地不能生活在已經黴菌污染的培養基 in. 有趣地正常的蚤蠅繁殖, 非常難得有黴菌污染. 我發現可能的原因, 發現 *Bacillus SK* 是一強硬的 antifungus 細菌. 試驗下列黴菌, 全部顯示



被 *Bacillus SK* 抑制. *Agaricus arvensis* CCRC 36371 *Aspergillus*



ochraceus CCRC 300101 *Aspergillus fumigatus* CCRC 30099 *Aspergillus niger* ATCC 9642 *Aspergillus flavus* CCRC 30119 *Aspergillus vesicolor* CCRC 30225 *Aspergillus candidus* CCRC31129 *Aspergillus terreus* CCRC 32664 (terrium production) *Aspergillus terreus* CCRC32653 *Saccharmyces cerevisiae* *Zygosacchomyces rouxii*. 人工的繁殖: 真菌污染的繁殖管, 可使用添加 *Bacillus SK* 來消滅黴菌. 芽孢桿

生活在人類的家居環境裡, 卻是過去我們自己所遺忘的本土動物. 蚤蠅科是雙翅目中最大的一科. 大約 250 屬 3000 種在地球動物群被報導. 多數蚤蠅被認為像一般腐爛的植物動物的清掃工. 其幼蟲也掠奪很多類有生命的食物像蛭蟪卵, 昆蟲卵, 蟲瘻蚜蟲, 根瘤蚜蟲. 若干蚤蠅

菌蛋白毒素對 *Bactocera dorsalis* 蠅幼蟲的作用: *Bactocera dorsalis* 的幼蟲被輕輕地使用小玻片蓋壓在玻璃片上 然後 Figure 40 *Bacillus* SK 的毒蛋白 1: *B. SK* 上清液 2: *B. subtilis* 上清液 3: *B. SK* 上清液加鹽沈澱 4: 濃縮未提純的 *Bacillus* SK 5,6: 使純化的 *Bacillus* SK 毒素六、討論 (一) 蚤蠅雖然在世界到處都找得到,甚至比果蠅更活躍地

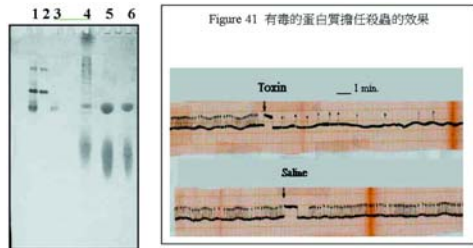


Figure 41 有毒的蛋白質擔任殺蟲的效果

甚至是行群居生活白蟻,兵蟻,蜜蜂,黃蜂的共生或者寄生體. 少數能食蕈類. 臺灣90年前,一位Sauter先生採集近五十新蚤蠅品種至歐洲,由Brues, Schmitz等研究得知. 惆悵的,蚤蠅好像是永遠被忘記的本土動物,對長久生活在臺灣的我還是十分陌生的名詞. 1965年,藏在匈牙利國家博物館珍貴的臺灣蚤蠅模式完全毀在大火裡頭,全世界研究學者積極地想再建立這獨一無二的寶藏. 這蠅過去在臺灣未經報導,通過鑑定確認為 *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera 雙翅目, Cyclorhapha 環裂亞目, Aschiza 無縫部, Phoridae 蚤蠅總科). (二) 蚤蠅 *Megaselia scalaris* 有散佈醫院細菌的能力. 電子顯微鏡顯示 *Megaselia scalaris* 也可能為散佈病毒的傳染媒介. 長久在臺灣臨床微生物實驗室拋棄的細菌培養皿被發現,卻被誤認為果蠅. 蚤蠅因為體型極小動作非常快,加上過去沒有明顯的傳染疾病牽涉; 有關臺灣蚤蠅的調查報告幾乎不存在. 這個研究 *Megaselia scalaris* 脂肪細胞裡頭發現包含濾過性病毒,加上全部DNA 也存在一條小的脫氧核糖核酸. 進一步地分析將闡明它的特性.

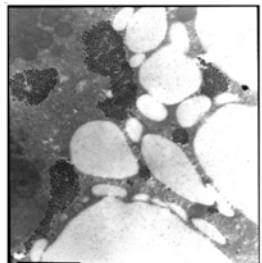


Figure 42 蚤蠅脂肪細胞的穿透性電子顯微鏡 TEM 照片顯示數以上萬計的電子稠密的 virus like 顆粒.

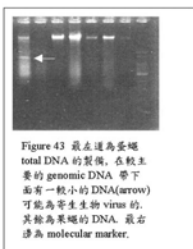
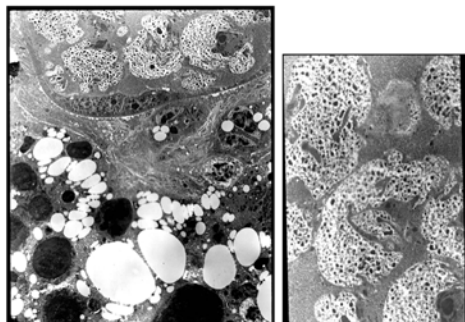


Figure 43 最近這為蚤蠅 total DNA 的裂解. 在較主要的 genomic DNA 帶下面有一較小的 DNA (arrow) 可能為寄生生物 virus 的. 其餘為果蠅的 DNA. 最右邊為 molecular marker.

(三) 人工的繁殖 process 出現的基本問題: 1. 實驗室研究發現我所能飼養的準星蚤蠅 (在分類上幾乎完全相同於 *Megaselia scalaris*), 不能生存在缺少蛋白質的果蠅標準用玉米黑糖膳食, 不容易成蛹在有大量 抗生素的蛋白質飲食裡. 2. 芽孢桿菌 SK 不只可以被充當蚤蠅幼蟲食物, 更重要的提供了蚤蠅從幼蟲發育到完全變化成為成蠅的要素. 3. 少量的 *Bacillus* SK 能在正常的時間間隔 製造標準的 metamorphosis. 4. 長時間人工的繁殖沒有添加 *Bacillus* SK 將促成黴菌漸漸地出現在養殖基. 如此時適當的再增加 *Bacillus* SK 的量又恢復繁殖原狀. (data not shown). 5. *Bacillus* SK 的角色不能使用其餘的 *Bacillus* spp. 來代替. (四) 整個研究最難回答的問題: *Bacillus* SK 雖然在 *Megaselia scalaris* 生命週期處處存在, 為什麼 *Megaselia scalaris* 還拼命搜尋補充 *Bacillus* SK 呢? 在幼蟲和蛹的解剖切片裡發現芽孢桿菌的存在, 此外蛹內液也可培育出 *Bacillus* SK 來. 但是我們也發現 *Megaselia scalaris* 使用 *Bacillus* SK 為唯一的食物時, 能在小腸壁細胞裡發現多量的細胞內包含體. Figure 44, 45 Evidence of Intracellular Phagocytosis of *Bacillus* SK By *Megaselia scalaris* 若干生物遇見它所需要的食物, 如同人類利用風乾, 鹽漬, 蜜餞, 酒釀或者冷藏的方式來處理和暫時保藏. 蚤蠅未必絕對需要依賴 *Bacillus* SK 來生存, 成蠅利用芽孢桿菌 SK, (1) 保護食物不被黴菌糟蹋提供幼蟲最好的食物. (2) 防止不同的蒼蠅競爭食物. (3) 促進它自己變異成熟. (4) 高等動物: 野獸或者鳥受制於 *Bacillus* SK 毒素, 不

會取食食物或者幼蟲。(5)必要的時候 *Bacillus SK* 也可充當食物。推論在最後的情況：*Megaselia scalaris* 體內的 *Bacillus SK* 將銳減。長時間無外面供應新鮮的 *Bacillus SK*, *Megaselia scalaris* 將喪失它的 antifungi 能力。 *Bacillus SK* 從某種角度來看, 好像是人類繁殖運用的狗來看門保護他的食物和土地, 防止其他兇猛動物的侵入。當然這種交互的共生現象, 在人類沒有食物吃時, 狗也會被吃掉。(五) 抑制黴菌, 殺死其它的蟻蠅的作用和 *Bacillus SK* 的分泌一種特別的蛋白分子 有關聯。這個抗菌類植物效力可能證實有



益於醫學或者科學的運用。(六) *Megaselia scalaris* 蚤蠅和 *Bacillus SK* 的基因分析和演化推釋。表露了現代分子生物技術結合傳統根據外表形態和生化發酵結果。來分類的重要性。從 *Megaselia scalaris* 蚤蠅的 18S rRNA 基因構看來: *Drosophila* and *aedes* 在分子演化較蚤蠅更是接近。(七) *Bacillus SK* 出身的 RAPD 研究 鑑別 *Bacillus SK*: *Bacillus SK* 不同於 *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus thermodenitrificans*, *Bacillus larvae*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus amylolyticus* 等, 除形態, 孢子形狀, 孢子位置, 和生化試驗 (Table 1) 可供參照。分子生物技術在分類上面也非常有

現代分子生物技術勝過傳統根據外表形態和生化發酵結果來分類。我非常感興趣的是 *Bacillus SK* 在蚤蠅進化和成長扮演的角色, 基因構造非常接近 *Bacillus subtilis* 而且主要核糖體 DNA 完全相同。 *Bacillus SK* 怎樣發展出毒素蛋白質怎麼和 *Megaselia scalaris* 蚤蠅發展出吸引的關係。這相關屬種蚤蠅的微生物種別將提供探究共存演化的良好模式。[七、應用 1.](#)

Megaselia scalaris 容許若干病毒粒子寄生生物, 我希望鑑定它的本質及可能的疫苗應用。2. *Bacillus SK* 對蚤蠅無害卻帶引誘作用, 具有毒殺多數蠅蟲的功能, 如果能殺死東方果實蠅 *Bactocera dorsalis* 幼蟲和進一步地 防護果實也許擁有極大的經濟影響。3. 建立世界性蚤蠅 DNA 資訊圖書館。4. 非常感興趣的是 *Bacillus SK* 在蚤蠅進化和成長扮演的角色, 希望繼續發現這個相關屬種的潛在微生物寶藏。[八、研究資訊來源](#) 特別向下列諸位前輩先生表示謝忱, 感激他們在我研究期間所提供的資訊和技術指導。林飛棧教授, 臺灣臺北南港, 中央研究院, 動物所。方淑博士, 臺灣臺北南港, 中央研究院, 動物所。

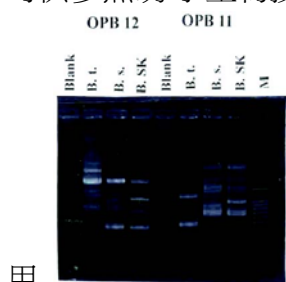


Figure 46
RAPD Analysis of *Bacillus* spp.
Bacillus subtilis and *Bacillus SK*
By Primers OPB11 and OPB12

Bacillus SK 在 RAPD 有許多 DNA bands 和 *Bacillus Subtilis* 一致, 卻各自也擁有特定的條紋。另外的 *Bacillus* (*B. thuringiensis* sp. *kurstak*) 差異很多。

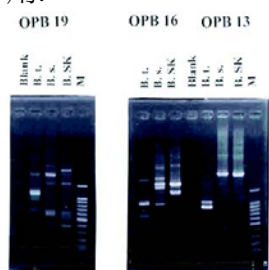


Figure 47
RAPD Analysis of *Bacillus* spp.
Bacillus subtilis and *Bacillus SK*
By Primers OPB13, OPB16 and OPB19

Bacillus SK 在 RAPD 有許多 DNA bands 和 *Bacillus Subtilis* 一致, 卻各自也擁有特定的條紋。另外的 *Bacillus* (*B. thuringiensis*)

劉廣純教授, 中國遼寧瀋陽, 農業大學, 植保系. 九、參考資料 1. 昆蟲類分科之檢索. 陶希易, 1969 臺灣商務印書圖書館. 2. 中國蠅類(上下冊). 薛萬琦, 趙建銘, 1998 遼寧科學技術出版社. 3. 昆蟲學(上中下冊). 貢穀紳, 1978 國立中興大學農學院出版委員會. 4. 中國蚤蠅分類研究. 劉廣純, 1993 西北農業大學, Ph.D 論文. 5. 昆蟲分類學. 周堯, 1964 西北農學院. 6. Barnes, J.K. 1990. First record genus *Phymatopterella* in the Nearctic Region and description of *P. ovatimacula*, a new hump backed fly from Florida (Diptera: Phoridae). *Florida Ent.* 73(4): 644-649. 7. Barnes, J.K. 1990. Life history of *Dohrniphora cornuta* (Bigot) (Diptera: Phoridae), a filth-habiting hump backed fly. *J. New York Ent. Soc.* 98(4): 474- 483



十、評語 本研究作品作者為高一學生，對生物的興趣甚濃厚，在偶然的機會看到蚤蠅（極小的動物之一）；欲瞭解牠的一切，因此做一些一連串的研究，包括人工培養，構造及分類，基因確認及演化，共生芽苞菌的角色等，不過因研究範圍過大，每一項研究工作作的較淺，內容較簡單，茲此建議作者選擇其中一項而做深入的研究，培養出科學者的素養。
